

膵B細胞における2相性インスリン開口放出機構のイメージング解析

今 泉 美 佳 藤 原 智 徳¹ 金 井 正 美²

杏林大学医学部生化学

¹ 杏林大学医学部細胞生理学

² 杏林大学医学部解剖学

研究の目的

インスリンは膵臓のランゲルハンス氏島にあるβ細胞より分泌され、標的細胞に作用することで血糖を効率的に下げる唯一のホルモンである。インスリンはβ細胞内の分泌顆粒（インスリン顆粒）に貯蔵されており、開口放出によって2相性に細胞外へ分泌される。2型糖尿病ではこの分泌形式が破綻していることから、2相性インスリン分泌機構の解明は、2型糖尿病の予防、治療法を開発するためにも非常に重要な課題であるが不明な点が多く残されている。インスリン分泌は分泌顆粒の貯蔵から開口放出までダイナミックに調節されており、単一顆粒レベルでの時空間的イメージング解析が強力な研究手段となる。私達はGFP標識インスリン顆粒システムと全反射蛍光（TIRF）顕微鏡を組み合わせたインスリン分泌顆粒動態の形質膜TIRFイメージング解析法を確立し、まず分泌第1相インスリン開口放出機構（形質膜SNARE蛋白質シンタキシン1Aに予めドッキングした顆粒からの開口放出機構）を解明した^{1,2)}。しかし分泌第2相インスリン開口放出機構は未だ不明である。分泌第2相は細胞質から形質膜へ新たに移動し、短時間しかドッキングしない顆粒（newcomers）が担っており、解明に向けては形質膜だけを観察する現状のTIRF顕微鏡では限界があり、より細胞内部まで同時に観察可能な顕微鏡システムが必須となる。本研究では、入射角可変式全反射蛍光（V-TIRF）顕微鏡を開発し、今まで測定困難だった細胞内部の顆粒の貯蔵から形質膜への移動、さらに開口放出までを高空間時間分解能で4D（x,y,z,time）イメージング解析し、2相性のインスリン開口放出の素過程の全容の解明を目的とした。

実験方法

V-TIRF顕微鏡は従来のTIRF顕微鏡^{3,4)}とは異なり、エバネッセント場を任意に調節することができるため、カバーガラス上の細胞の形質膜近傍から細胞質内部までの蛍光変化を任意の厚さで高空間分解能で観察可能な顕微鏡である⁵⁾。これにより今まで測定困難だった細胞内部での顆粒の貯蔵から形質膜への供給さらに開口放出までを高空間時間分解能で4D(x,y,z,t)解析することが可能となる。今回、このV-TIRF顕微鏡（図1）を用いて、β細胞にGFP-insulinおよびmCherry-actinを発現させることでmCherry標識したアクチンとGFP標識インスリン顆粒を同時可視化解析し、分泌第2相における細胞内部での顆粒の貯蔵、形質膜への移動、及びそれに伴うアクチン動態変化の実態を観察した。

結果と考察

V-TIRF顕微鏡を用いて、まずβ細胞内のインスリン顆粒の貯蔵状態を調べたところ、細胞には形質膜上の顆粒のプールと、形質膜より約400-500nm内部に存在する細胞質内顆粒プールの少なくとも2つの顆粒の貯蔵プールが存在していた（図1）。高グルコース刺激下での分泌第1相に相当する刺激後5分以内のインスリン分泌では、前者の形質膜上貯蔵プールの顆粒（previously docked granules）のフュージョンが選択的に観察された。一方、刺激後5分以降のインスリン分泌第2相では、後者の細胞質内貯蔵プールより形質膜に選択的に供給され、非常に短時間（<50 ms）dockingした顆粒のフュージョンが観察された。このように新規V-TIRF顕微鏡を用いて、2相性インスリン分泌を担っているnewcomer顆粒の細

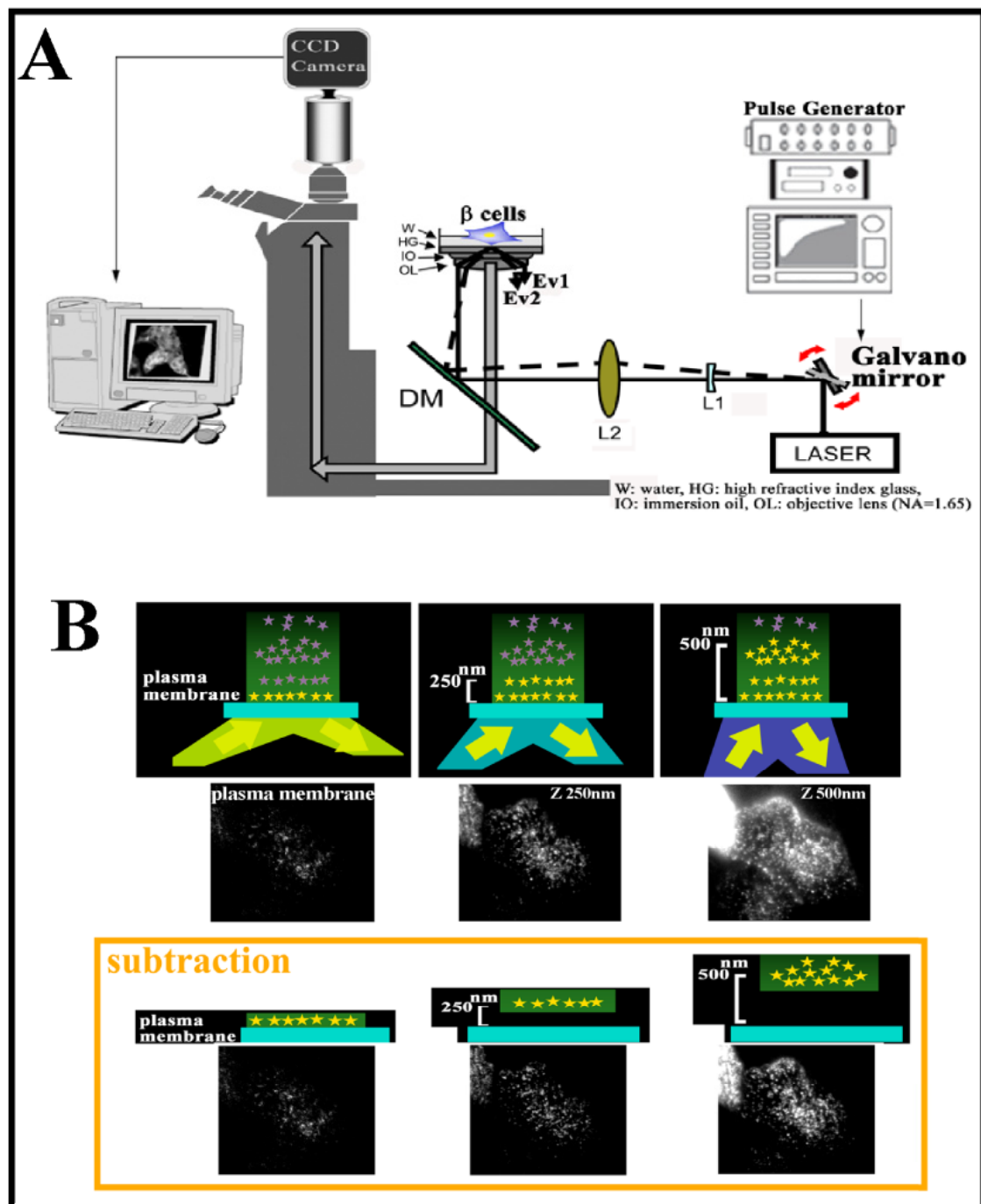


図1 V-TIRF システム

A) パルスジェネレーター制御によりガルバノミラーを高速に駆動させ、レーザー入射角の異なる TIRF 照明を作り、細胞の TIRF 照明領域（形質膜から約 500nm 細胞内部まで）を高速に変化させる。B) システムではガルバノミラーを 3 ステップ (TIRF 沁み出し厚 $Z < 100\text{nm}$, $Z < 250\text{nm}$, $Z < 500\text{nm}$) で駆動させ、各ステップ 50-ms interval で画像取得している (1 サイクル 150-ms で駆動)。 $Z < 100\text{nm}$ では GFP 標識したインスリン顆粒の細胞形質膜へのドッキング状態, $Z < 500\text{nm}$ では細胞内部のインスリン顆粒貯蔵プールが可視化できる。これにより今まで測定困難だった貯蔵部位 ($Z < 500\text{nm}$) から形質膜へ顆粒の移動 ($Z < 250\text{nm}$)、さらに開口放出まで ($Z < 100\text{nm}$) を高空間時間分解能で 4D 解析することが可能である。

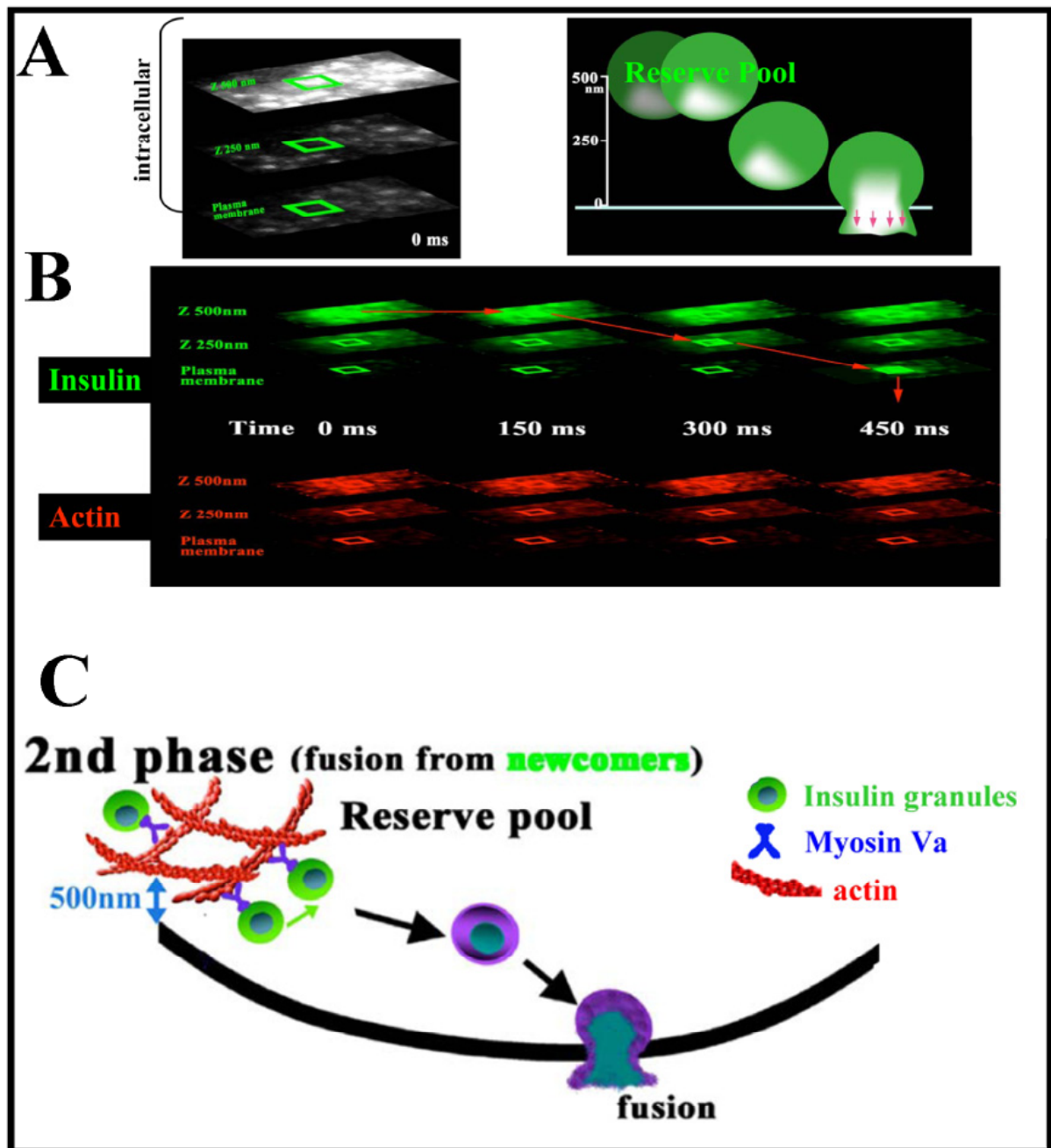


図2.インスリン分泌第2相におけるインスリン顆粒およびF-Actin動態のTwo-color V-TIRF解析

A) 刺激後5分以降のインスリン分泌第2相において、Z500nmに存在する細胞質内貯蔵プールに存在していた顆粒がZ250nmを通過してplasma membraneに動いて行きfusionする様子、すなわちnewcomerの細胞内貯蔵、形質膜への移動、および形質膜とのfusionをとらえることに成功した。B) Z500nmに存在する細胞質内貯蔵プールはアクチンネットワークによって保持されていることがわかった。C) 分泌第2相でみられるnewcomerの細胞内貯蔵プールであるReserve poolは、形質膜から500nm細胞内部に存在すること(顆粒の直径が約300nmであることから、Reserve poolは形質膜上、約顆粒2個分の位置に相当)、またさらにReserve poolはアクチンネットワークと共存しており、ミオシンVaによって制御されている。

胞内貯蔵プール及びフュージョンまでの細胞内トラフィックの実態を初めて明らかにすることができた (図1)。

β 細胞内インスリン顆粒 (GFP) とアクチン (mCherry) を同時に Two-color VTIRF 解析したところ, アクチンネットワークは細胞質内貯蔵プールを保持しており, 刺激により重合/脱重合による動態変化起こし, 脱重合された領域で形質膜へ newcomer 顆粒が輸送されていた (図2)。また newcomer 顆粒とアクチンネットワークとの相互作用に分子モーターであるミオシン V a が関与していることをミオシン V a 欠損ラット (Dilute-opisthotonus rats) から調製した β 細胞を用いて明らかにしており, その調節分子機構を現在検討している。以上の結果は, アクチン重合/脱重合の空間的制御およびミオシン V a が第2相分泌における newcomer 顆粒の細胞内輸送を制御していることを強く示唆している (論文投稿準備中)。

第2相のインスリン放出はグルコース等の燃料基質による刺激にのみ見られ, 高カリウム刺激では第1相だけが観察されること, また細胞内 ATP の低下によって減少することが知られており, 第2相分泌はグルコース代謝により細胞内で持続して産生される ATP を介した反応と考えられる。また第2相においても細胞内 Ca^{2+} 上昇が必須であり⁶⁾, R-type 電位依存性 Ca^{2+} チャンネル (Cav 2.3) が活性化されることが最近報告された。従って, 第2相インスリン放出は第1相 Ca^{2+} 上昇機構⁷⁾とは異なった Ca^{2+} チャンネルによりさらに上昇した細胞内 Ca^{2+} と ATP が共役して, アクチンやミオシン V a 等の細胞骨格系タンパク質を調節することにより, 顆粒の形質膜への移送を調節している可能性が考察される⁸⁾。

参考文献

1. Ohara-Imaizumi, M., Fujiwara T., Nakamichi Y., Okamura T., Akimoto Y., Kawai J., Matsushima S., Kawakami H., Watanabe T., Akagawa K. and Nagamatsu S. J. Cell Biol. 177: 695-705, 2007.
 2. Nagamatsu S., Ohara-Imaizumi, M., Cell biology. Science. 318:1249-50, 2007.
 3. Nagamatsu S., Ohara-Imaizumi, M. Methods in Molecular Biology 440: 251-260, 2007.
 4. Ohara-Imaizumi M, Aoyagi K, Akimoto Y, Nakamichi Y, Nishiwaki C, Kawakami H, Nagamatsu S. Biochem Biophys Res Commun. 390:16-20, 2009.
 5. Wakazono, Y., Sakurai, T., Ohara-Imaizumi, M., Nagamatsu S., Yamamoto, S., Terakawa. S. Proc. SPIE. 6088: 449-454, 2006.
 6. Ohara-Imaizumi M, Aoyagi K, Nakamichi Y, Nishiwaki C, Sakurai T, Nagamatsu S. Biochem Biophys Res Commun. 385:291-5, 2009.
 7. Aoyagi K, Ohara-Imaizumi M, Nishiwaki C, Nakamichi Y, Nagamatsu S. Exp Diabetes Res. 2009:278762, 2009.
 8. 今泉美佳, 永松信哉 糖尿病学の進歩 2009 pp20-24, 2009.
- #### List of publications
1. Ohara-Imaizumi M¹, Aoyagi K¹, Nakamichi Y¹, Nishiwaki C¹, Sakurai T², Nagamatsu S¹ (¹Department of Biochemistry, Kyorin University School of Medicine, ²Photon Medical Research Center, Hamamatsu University School of Medicine,) Pattern of rise in subplasma membrane Ca^{2+} concentration determines type of fusing insulin granules in pancreatic beta cells. Biochem Biophys Res Commun. 385:291-295. 2009
 2. Ohara-Imaizumi M¹, Aoyagi K¹, Akimoto Y², Nakamichi Y¹, Nishiwaki C¹, Kawakami H², Nagamatsu S¹ (¹ Department of Biochemistry, Kyorin University School of Medicine, ²Department of Anatomy, Kyorin University School of Medicine.): Imaging exocytosis of single glucagon-like peptide-1 containing granules in a murine enteroendocrine cell line with total internal reflection fluorescent microscopy. Biochem Biophys Res Commun. 390:16-20. 2009
 3. Aoyagi K, Ohara-Imaizumi M, Nishiwaki C, Nakamichi Y, Nagamatsu S. (Department of Biochemistry, Kyorin University School of Medicine.): Glinide, but not sulfonylurea, can evoke insulin exocytosis by repetitive stimulation: imaging analysis of insulin exocytosis by secretagogue-induced repetitive stimulations. Exp Diabetes Res. 2009:278762. 2009
 4. 今泉美佳, 永松信哉 (杏林大・医・生化学): インスリン顆粒の細胞内 trafficking (β 細胞研究の最前線) 糖尿病学の進歩 2009, (社) 日本糖尿病学会編, 診断と治療社, 東京, pp20-24, 2009
 5. 江口博人¹, 今泉美佳², 近岡洋子¹, 佐藤栄人¹, 波田野琢¹, 久保紳一郎¹, 永松信哉², 水野美邦¹, 服部信孝¹ (¹順天堂大・医・脳神経内科, ²杏林大・医・生化学): Parkin の放出機構への影響の検討. 順天堂医学. 55 巻 3 号 Page386 2009

萎縮性胃炎および胃癌患者の胃内フローラの解析

-*Helicobacter pylori* による持続感染および発癌を調節する胃内細菌の探求 -

神 谷 茂 高 橋 信 一¹ 徳 永 健 吾¹
花 輪 智 子 米 澤 英 雄 大 崎 敬 子

杏林大学医学部感染症学

¹ 杏林大学医学部第三内科学

目的

Helicobacter pylori は 1982 年オーストラリアの Warren & Marshall により慢性胃炎患者の胃粘膜より分離されたグラム陰性らせん状細菌である。*H. pylori* は急性および慢性胃炎を引き起こすとともに、胃癌の発症との関連性が報告され、WHO により definite carcinogen group1 として認定されている。本菌のスナネズミへの長期感染は胃癌を誘導することが明らかにされているが、いかにして本菌が発癌を引き起こすかについては解明されていない。

生体には人体細胞（約 60 兆個）よりも多い数（100 兆個以上）の正常細菌（フローラ）が存在している。強酸下の胃内にも極めて多数の正常細菌が存在しているため、これらの細菌が *H. pylori* の胃内持続感染およびその発癌プロセスを調整していることが想定される。これまでに胃内細菌と *H. pylori* の関連を解析した研究は極めて少ない。Bik ら (1) は 29 名の健常人胃粘膜を対象として胃内フローラを分子遺伝学的に解析した結果、*H. pylori* の存在は胃内フローラに影響を与えないことを報告した。また、Sun ら (2) は *H. pylori* 感染がスナネズミの胃内フローラに影響を及ぼさないことを報告した。しかし、これらの報告はいずれも胃内疾患を有さない胃粘膜を対象とした研究であり、胃病変を有する個体での *H. pylori* と胃内細菌の関連性を解析したものではない。

本共同研究は *H. pylori* 陽性および陰性の萎縮性胃炎（胃癌の前駆病変）および胃癌患者における胃内フローラを解析するものである。本研究により、*H. pylori* 陽性の萎縮性胃炎および胃癌患者に優勢な胃内細菌は胃発癌に関与する可能性が引き出される。また、*H. pylori* 陰性の萎縮性胃炎および胃癌患者に優勢な胃内細菌は *H. pylori* の定着を抑制するか、単独で胃発癌に関与する可

能性が引き出される。

本研究では胃内フローラの分子遺伝学的解析結果に基づき、胃内細菌の分離培養を行い、上記の可能性をスナネズミ感染モデルを使用して検討を加える。本研究により、胃発癌を調節する胃内細菌や *H. pylori* 感染を抑制する胃内細菌の一面が明らかになることが期待され、基礎医学のみならず臨床医学的にも意義のある研究となる。近年、*H. pylori* に対する除菌治療に際して、薬剤耐性菌の増加が問題となっている。薬剤耐性菌にも抗菌作用をもつプロバイオティクスが補助的な除菌治療法の一つとして使用されることが今後の *H. pylori* 除菌療法の際に期待されている。後者の胃内細菌の分離は薬剤耐性 *H. pylori* に有効に作用する新たなプロバイオティクスの開発にもつながり得る。

材料と方法

萎縮性胃炎患者および胃癌患者の胃内フローラの解析

萎縮性胃炎患者 10 名および胃癌患者 10 名より内視鏡的に胃粘膜を採取する。*H. pylori* の存在は分離培養および *H. pylori* 特異的 16SrRNA 遺伝子をプライマーとした PCR 法により検出した。胃内フローラの解析は以下の分子遺伝学的手法によった。

胃内フローラの分子遺伝学的解析

胃内フローラの解析には細菌各菌種特異的な 16S-rRNA 遺伝子をターゲットとする 11 種のプライマーを作成し、リアルタイム-PCR 装置を使用して定量的解析を行った。対象とするフローラ構成細菌は *Atopobium* cluster, *Bifidobacterium*, *Bacteroides fragilis* group, *Clostridium coccoides* group, *Clostridium leptum* subgroup, *Clostridium ramosum* subgroup, *Prevotella*, *Eubacterium*

cylindroides group, *Fusobacterium*, *Veillonella*, *Lactobacillus* の計 11 種類とした。

胃粘膜よりの胃内細菌の分離培養

H. pylori 陽性の萎縮性胃炎および胃癌患者胃内フローラで優勢に検出される菌属を特定した後、当該菌属の分離用培地を用いて好気性および嫌気性分離培養を行い、1 検体あたり 20-30 コロニーの分離菌株を得た。同様に *H. pylori* 陰性の萎縮性胃炎および胃癌患者からも 1 検体あたり 20-30 コロニーの分離菌株を得た。

結果

萎縮性胃炎患者 10 名 (*H. pylori* 陽性者および陰性者 5 名ずつ) および胃癌患者 10 名 (*H. pylori* 陽性者および陰性者 5 名ずつ) より、内視鏡的に胃粘膜を採取する予定であったが、これまでに萎縮性胃炎患者 8 名、胃癌患者 1 名に対して解析が行なわれた。培養法により胃粘膜フローラ構成細菌を分離するとともに、胃生検材料から全 DNA を抽出し胃内フローラの構成を解析した。フローラ解析のためには、*Atopobacterium*, *Bacteroides fragilis* group, *Bifidobacterium* 属, *Eubacterium cylindroides* group, *Enterococcus* 属, *Lactobacillus* 属, *Streptococcus* 属, *Veillonella* 属菌特異的プライマーを使用し、リアルタイム-PCR により定量的に解析した。さらに、*H. pylori* の存在については、培養および PCR により判定した。

胃炎患者 8 名のうち、*H. pylori* 陽性者は 4 名、陰性者は 4 名で、培養の結果と PCR による結果が一致していた。表 1 に示したように、DNA を用いた胃内フローラの定量解析からは、*Streptococcus* 属が最も高頻度に検出されたが、*H. pylori* 陽性と陰性の患者による差は認められなかった。*Atopobacterium* 属菌、*Enterococcus* 属菌、*Lactobacillus* 属菌、*Veillonella* 属菌が認められ、これらの菌はいずれも *H. pylori* 陽性の患者にのみ検出された。*Bacteroides fragilis* group, *Eubacterium cylindroides* group, *Bifidobacterium* 属菌はすべての患者から検出されなかった。この結果は、*H. pylori* 感染が、胃酸分泌の低下などを介して、胃内の環境を他の細菌生存に適した環境へと変化させている可能性を示唆するものである。

胃粘膜から培養法によって分離された菌株については、分子生物学的手法、すなわち、16SrDNA 遺伝子配列を決定する方法で同定を行った。得られた菌株より DNA を抽出し、16SrDNA に対するユニバーサルプライマー (27-F:AGAGTTTGATCMTGGCTCAG, 1492-R: TACGGYTACCTTGTTACGACTT) で増幅し、得られた産物のうち可変領域 (V5) を含む領域の配列を決定し、Blast search によって菌種名または菌属名を決定した。その結果は前述の表 1 の結果と同様、*Streptococcus* 属が最優勢となり、培養陰性の一例を除くすべての患者

から検出された。分離菌は *S. salivarius*, *S. parasanguis*, *S. mitis*, *S. oralis* が多く、これらは口腔由来の *Streptococcus* 属細菌であると考えられた。その他の分離細菌として、*Neisseria* 属菌、*Actinomyces* 属菌、*Rothia* 属菌などが検出された。これらの細菌は、胃癌症例からも同様に検出された。胃粘膜から培養される細菌は口腔由来の細菌であり、通性嫌気性の細菌であったが、少数例ではあるが *Veillonella parvulla* など偏性嫌気性細菌が検出された。

考察

生体に棲みついている正常細菌叢は生体に利益的に作用して、健康の維持、疾病の予防に役立っているものと考えられている (3)。胃酸の分泌により、胃粘膜は酸性を示し、外来性の病原細菌を殺菌することにより、生体防御の一端を担っている。しかし、胃内環境にも各種の細菌が持続的に感染し、正常胃内細菌叢を形成している。我々はすでにスナネズミを使用して *H. pylori* 感染モデルを樹立化して、本菌の定着性、腫瘍原性、垂直感染に関する研究を行なってきた (4-7)。

H. pylori のスナネズミへの感染は慢性持続感染の後、消化性潰瘍および胃癌を誘導することが知られ、ヒトに対する病態と類似している。我々は既に *H. pylori* 感染スナネズミモデルを使用して、スナネズミ胃粘膜での *H. pylori* の定着性を調べた結果、本菌の検出頻度が各個体により大きく異なることを明らかにした (8)。高頻度検出群スナネズミおよび低頻度検出群スナネズミの胃内細菌を解析した結果、高頻度検出スナネズミに特異的な胃内細菌として *Eubacterium limosum* が同定された。一方、低頻度検出スナネズミに特異的な胃内細菌として *Lactobacillus* が同定された。これらの結果はある種の胃内細菌が *H. pylori* の胃内定着を調節している可能性を示している。

本研究ではヒトの胃内細菌叢を解析してフローラ解析を行なった。胃炎症例で認められたフローラ構成菌は培養法、DNA 法ともに *Streptococcus* 属菌が最優勢で *H. pylori* の存在による影響は見られなかった。しかし、*Atopobacterium* 属菌、*Enterococcus* 属菌、*Lactobacillus* 属菌、*Veillonella* 属菌については *H. pylori* の影響が認められた。これらの結果はヒト胃粘膜において胃内正常細菌叢が *H. pylori* の持続感染を調節している可能性を示すものである。今後、胃癌症例を増やし、胃内フローラが発癌メカニズムの一端を担う可能性について検討する予定である。

文献

1. Bik, E., P. Eckburg, S. Gill, K. Nelson, E. Purdom, F. Francois, G. Perez-Perez, M. Blaser, and D. Relman. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human

Log number of bacteria/ biopsy						
	<i>H. pylori</i>	<i>Atopobacterium</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Veillonella</i>
GI- 8	5.8	4.1	1.9	ND	6.4	3.0
GI- 3	6.3	5.1	1.8	ND	6.3	ND
GI- 6	6.4	5.5	2.6	7.3	5.4	3.1
GI- 7	6.9	ND	ND	ND	ND	
GI-1	ND	ND	ND	ND	6	ND
GI- 2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
GI- 4	ND	ND	ND	ND	4.4	ND
GI- 5	ND	ND	ND	ND	6.9	ND
GCa-1-1	ND	ND	ND	ND	5.9	ND

表 1 . 菌属菌群特異的 16S rRNA 遺伝子による萎縮性胃炎および胃癌患者の胃内細菌叢の解析

- stomach. Proc Natl Acad Sci USA 103:732-737, 2006
2. Sun, Y., H. Monstein, L. Nilsson, F. Petersson, and K. Borch. Profiling and identification of eubacteria in the stomach of Mongolian gerbils with and without *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 8:149-157, 2003.
3. 神谷 茂 : 腸管感染症とプロバイオティクス, 医学のあゆみ 207, 894-898, 2003.
4. Yamaguchi H, Osaki T, Taguchi H, Sato N, Toyoda A, Takahashi M, Kai M, Nakata N, Komatsu A, Atomi Y & Kamiya S: Effect of bacterial flora on postimmunization gastritis following oral vaccination of mice with *Helicobacter pylori* heat shock protein 60. *Clin Diag Lab Immunol* 10:808-812, 2003.
5. Nakagawa S, Osaki T, Fujioka Y, Yamaguchi H & Kamiya S : Long-term Infection of Mongolian gerbils with *Helicobacter pylori*: Microbiological, histopathological, and serological analyses. *Clin Diagn Lab Immunol.* 12:347-353. 2005.
6. Osaki T, Hanawa T, Manzoku T, Fukuda M, Kawakami H, Suzuki H, Yamaguchi H, Yan X, Taguchi H, Kurata S, Kamiya S.: Mutation of luxS affects motility and infectivity of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa of a Mongolian gerbil model. *J Med Microbiol.* 55:1477-1485, 2006
7. Oshio I, Osaki T, Hanawa T, Yonezawa H, Zaman C, Kurata S, Kamiya S: Vertical *Helicobacter pylori* transmission from Mongolian gerbil mothers to pups. *J Med Microbiol* 58:656-662, 2009
8. Zaman C, Osaki T, Hanawa T, Yonezawa H, Kurata S, Kamiya S: Analysis of the microflora in the stomach of Mongolian gerbils infected with *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol Hepatol* 25:S11-S14, 2010

有機酸トランスポーター NPTs の高尿酸血症発症分子機序の解明

山 田 明 櫻 井 裕 之 要 伸 也
福 岡 利 仁 木 村 徹¹ 福 富 俊 之¹

杏林大学医学部第一内科学

¹ 杏林大学医学部薬理学

①研究目的

ヒト及び霊長類は、尿酸酸化酵素を欠損しているため、尿酸は代謝を受けずに腎臓より排泄される。ヒト腎臓では尿酸再吸収に働く *urate/anion exchanger* の存在により腎尿酸輸送は再吸収優位となり、他の哺乳類と比べ血中尿酸値が高い。そこで尿酸排泄低下は高尿酸血症・痛風の原因となり、尿酸排泄亢進が腎性低尿酸血症の成因となる。薬理学教室では血中尿酸値の決定に関与する尿酸トランスポーター (URAT1) 遺伝子同定に成功し、これが腎尿管腔側膜の *urate/anion exchanger* であり、URAT1 遺伝子変異が特発性腎性低尿酸血症の要因となることを報告した (Enomoto et al., Nature, 2002)。更に共同研究者の櫻井らは 2008 年に尿酸排出トランスポーター URATv1 の同定に成功し、既に分子同定のなされている尿酸トランスポーター URAT1 と URATv1 がタンデムになり腎尿管での経細胞性尿酸輸送を担うことを示唆した (Anzai et al. J Biol Chem, 2008)。

最近薬物等の有機酸を輸送するトランスポーターとして知られている Na^+ 依存性リン酸トランスポーター NPT (SLC17) ファミリーのいくつかのアイソフォーム NPT1, 4, 5 (SLC17A1, A3, A4) が、高尿酸血症発症と関連することが全ゲノム関連解析により示された (Dehghan et al. Lancet, 2008)。NPT1 は有機酸輸送を担う事が示唆されているが、他の NPTs の輸送基質は未だ不明のままである。

そこで本研究では NPTs の高尿酸血症発症における役割の解明を目指し、NPT の 3 つのアイソフォームによる尿酸輸送の *in vitro* における解析を行うと同時に、高尿酸血症患者の遺伝子解析により高尿酸血症と関連する NPT 遺伝子変異の同定を試みた。

②研究方法

1. アフリカツメガエル卵母細胞を用いた機能解析

ブタ pOATv1 およびヒト NPT cRNA は常法に従い、pOATv1 および NPT cDNA を含む plasmid を Hind III で linearize した後、精製したものを鋳型として T7 RNA ポリメラーゼを用いた *in vitro* 転写により得た。pOATv1 ないし NPT cRNA (10 ng) を卵母細胞に注入し、ゲンタマイシン (50 $\mu\text{g/ml}$) を含む 18°C の Barth 溶液 (88 mM NaCl, 1 mM KCl, 0.33 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0.4 mM CaCl_2 , 0.8 mM MgSO_4 , 2.4 mM NaHCO_3 , and 10 mM HEPES) を用いてインキュベートした。2 日から 3 日の培養後、室温の ND96 溶液 (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 5 mM HEPES, pH 7.4) に移し、RI 標識化合物の取込み実験を行った。

2. 高尿酸血症患者遺伝子解析

家族歴のある排泄低下型高尿酸血症患者から、インフォームドコンセントを得た後、末梢血よりゲノム DNA を抽出し、NPT4 の 13 個のエクソン特異的プライマーを用いて増幅した DNA に対するシーケンスを行い、NPT4 の遺伝子変異の同定を試みた。

③結果

1. アフリカツメガエル卵母細胞を用いた Na^+ 依存性リン酸トランスポーター NPT1 の機能解析 (図 1)

1.1. ブタ OATv1 による尿酸輸送

初めに実験系のポジティブコントロールとして、ブタ OATv1 cRNA をアフリカツメガエル卵母細胞に注入し、2—3 日経過後に RI 標識尿酸の 1 時間取込み量を測定した。その際に卵母細胞の培養液として通常の ND96 溶液に加え、ND96 溶液の Na イオンを K イオンに置換し

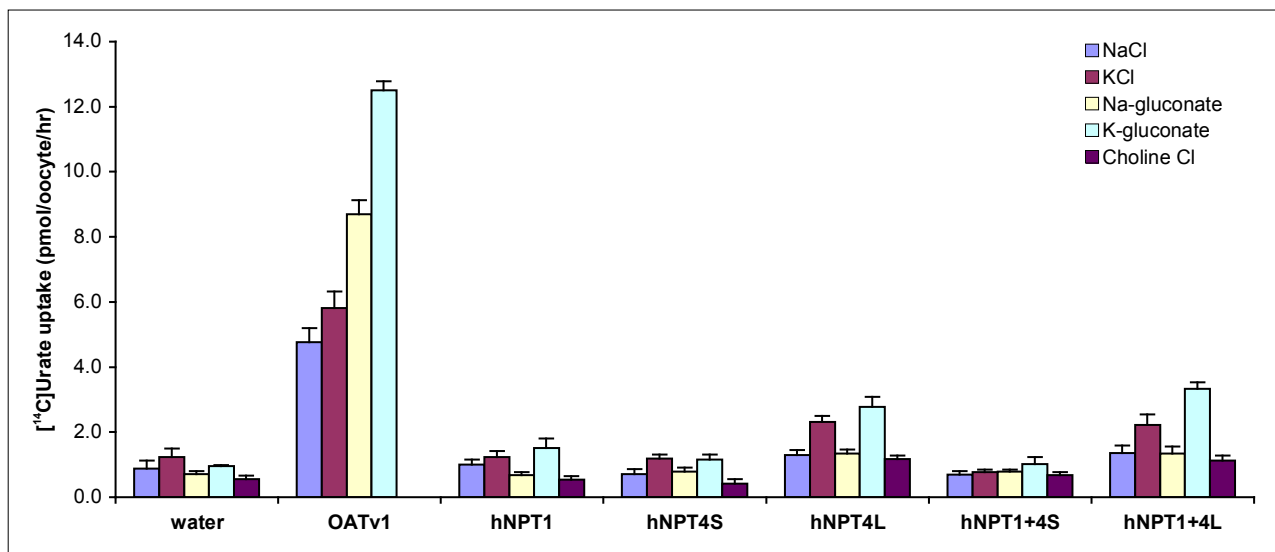


図 1

た溶液 (KCl 液), ND96 溶液の Cl イオンをグルコン酸に置換した溶液 (Na-gluconate 液), ND96 溶液の Na イオンおよび Cl イオンをそれぞれ K イオンおよびグルコン酸に置換した溶液 (K-gluconate 液), さらに ND96 溶液の Na イオンをコリンに置換した溶液 (Choline Cl 液) の合計 5 種類の溶液における尿酸取込み量を比較した。その結果, pOATv1 では既報の通り, Na から K 置換では軽度の, Cl からグルコン酸置換では著明な尿酸取込み量の増加を認めた。ここで今回のアフリカツメガエル卵母細胞実験系は有効に機能している事が確認された。

1.2. ヒト NPT1 による尿酸輸送

続いてヒト NPT1 (SLC17A1) による尿酸輸送を検討した。既に輸送する事が知られている代表的有機酸であるパラアミノ馬尿酸 (PAH) の RI 標識体は有意に輸送されたが (data not shown), 図 1 に示すように Na から K 置換, および Cl からグルコン酸置換での NaCl 条件に比較しての尿酸輸送の増加は極めて小さかった。

1.3. ヒト NPT4 short form(hNPT4S) による尿酸輸送

次にヒト NPT4 (SLC17A3) による尿酸輸送を検討した。ヒト NPT4 では, エクソンを 13 個持つ long form と, 4 番目のエクソンを欠損する short form の 2 つがあることが NCBI Genbank にて報告されている。そこでまずヒト NPT4 short form cRNA だけを単独で卵母細胞に発現させて RI 標識尿酸の取込みを調べたが, 図 1 に示すように Na から K 置換, および Cl からグルコン酸置換での増加は極めて小さかった。

1.4. ヒト NPT4 long form(hNPT4L) による尿酸輸送

続いてヒト NPT4 (SLC17A3) long form による尿酸輸送を検討した。図 1 に示すように Cl からグルコン酸置換での増加は極めて小さかったものの, Na から K 置換により約 2 倍の尿酸輸送活性の増加を観察できた。この

ことは hNPT4L が電位依存性に尿酸を輸送する可能性を示唆している。

1.5. ヒト NPT1 および NPT4 short form 共発現による尿酸輸送

イオンチャネルでは, 同じファミリーの遺伝子では異なるアイソフォームがヘテロマルチマーを形成してチャネルとして機能する事が報告されている。ヒト NPT1 (SLC17A1) とヒト NPT4 (SLC17A3) は同じ SLC17 ファミリーの中でも相同性が高い (約 50%) ため, 共発現により尿酸輸送活性が増加する可能性も考えられる。そこで両者の cRNA を同一卵母細胞に注入した際に観察される尿酸輸送活性を検討した。hNPT1 と hNPT4S の共注入を行うと, 図 1 に示すようにイオン置換は尿酸輸送に殆ど影響を与えなかった。

1.6. ヒト NPT1 および NPT4 long form 共発現による尿酸輸送

同様に hNPT1 と hNPT4L の共注入を行ったが, 図 1 に示すように hNPT4L 単独の条件での結果と比較し大きな相違は認められなかった。

1.7. ヒト NPT5 による尿酸輸送

ヒト NPT5 (SLC17A4) による尿酸輸送を検討したが, 明らかな尿酸輸送活性は認められなかった。

2. 排泄低下型高尿酸血症患者症例 NPT4 遺伝子の解析

1. での検討の結果, NPT4(SLC17A3) において尿酸輸送活性が認められたため, 父親, 男兄弟に関節炎の既往のある排泄低下型を示す高尿酸血症患者から得られた血液から抽出したゲノム DNA を対象に, 13 個ある SLC17A3 エクソンに対する特異的プライマーを用いたシーケンシングを行った。

その結果, (現在も継続中であるが) 杏林大学病院症例

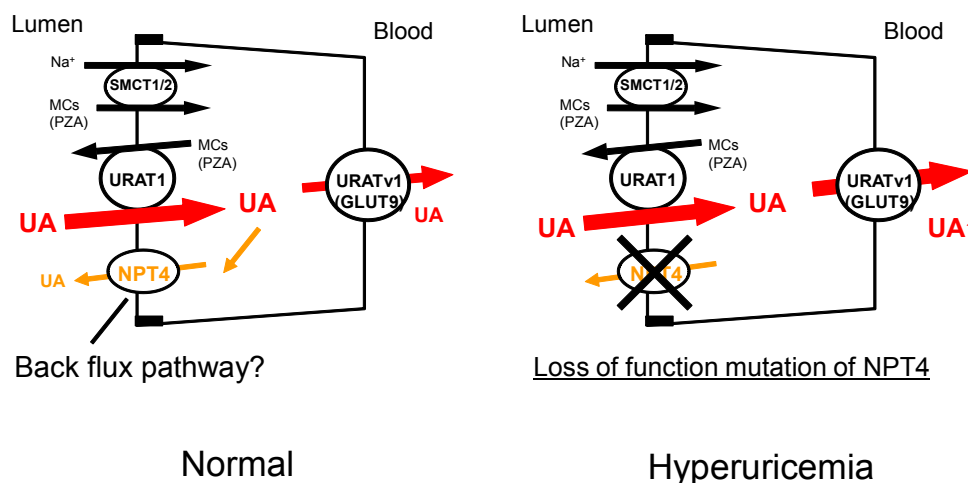


図 2

の中から hNPT4 遺伝子変異を見出す事はできなかった。

④考察

全ゲノム関連解析により高尿酸血症発症と関連することが示された Na⁺ 依存性リン酸トランスポーター NPT (SLC17) ファミリーのいくつかのアイソフォーム NPT1, 4, 5 (SLC17A1, A3, A4) の尿酸輸送活性の解析を行った。その結果 NPT4 (SLC17A3) 遺伝子発現卵母細胞での電位依存性尿酸輸送活性を見出す事ができた。同時に行われた検討により、NPT4 はヒト腎臓近位尿細管管腔側膜にそのタンパク質発現を認める事(投稿中)から、hNPT4 はヒト腎臓の尿酸の経細胞性輸送に関与して、直接的に血中尿酸値の影響を与える可能性がある。さらに並行して行われている共同研究施設で解析された排泄低下型高尿酸血症患者症例のゲノム解析の結果 2 つの多型ではない hNPT4 遺伝子変異が見出された(投稿中)ことから、図 2 に示すように、従来近位尿細管管腔側膜の URAT1 と基底側膜の URATv1 がタンデムになって担っている尿酸再吸収のリーク経路として働いている NPT4 に機能低下を伴う遺伝子変異が生じる事で、リークしていた分がさらに再吸収に回る事で、高尿酸血症発症につながるという仮説が提案される。

今後は今回の検討結果をもとに、さらに詳細な腎尿酸代謝の分子機序の解明を行い、新規尿酸排泄薬開発につなげたい。

講演記録

1. Promsuk Jutabha, Naohiko Anzai, Shuji Kaneko¹, Hiroyuki Sakurai (1 京大院・薬) (ポスター): Voltage-dependent transport of urate on a novel human urate efflux transporter URATv1 expressed in *Xenopus* oocytes, Satellite Symposium of the 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS) in Tokyo, 千代田区/港区,

平成 21 年 7 月 25 日

2. Promsuk JUTABHA, Naohiko ANZAI, Hitoshi ENDOU, Hiroyuki SAKURAI (ポスター): The voltage-driven organic anion transport of type I sodium-phosphate cotransporter and OATv1, Satellite Symposium of the 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS) in Tokyo, 千代田区/港区, 平成 21 年 7 月 25 日
3. Promsuk JUTABHA, Naohiko ANZAI, Hitoshi ENDOU, Hiroyuki SAKURAI (ポスター): The voltage-driven organic anion transport of type I sodium-phosphate cotransporter and OATv1, 36th International Congress of Physiological Sciences, 京都, 平成 21 年 7 月 29 日
4. 安西尚彦, Promsuk Jutabha, 金子周司¹, 櫻井裕之 (1 京大院・薬) (ポスター): 電位依存性尿酸トランスポーターの輸送特性, 文部省科研費補助金特定領域研究「生体膜トランスポートソームの分子構築と生理機能」平成 21 年度第 1 回班会議, 阿蘇, 平成 21 年 8 月 26-28 日
5. Promsuk Jutabha, Naohiko Anzai, Shuji Kaneko¹, Hitoshi Endou, Shunya Uchida², Hiroyuki Sakurai (1 京大院・薬, 2 帝京大・医): Molecular identification of a novel human voltage-driven organic anion transporter hOATv1: a luminal exit path of loop diuretics, 第 15 回分子腎臓研究会、京都、平成 21 年 9 月 5 日
6. 安西尚彦: トランスポーター: 上皮細胞における有機溶質輸送の分子機序、京都大学医学研究科腫瘍生物学講座公開セミナー、京都、平成 21 年 9 月 16 日
7. 櫻井裕之: 尿酸トランスポーター — 最近の知見 — 第 5 回腎・膠原病治療研究会、東京、平成 21 年 9 月 18 日
8. Promsuk Jutabha, Naohiko Anzai, Shuji Kaneko¹, Hitoshi Endou, Shunya Uchida², Hiroyuki Sakurai (1 京大院・薬, 2 帝京大・医) (ポスター): Molecular identification of a novel human voltage-driven organic anion transporter hOATv1: a luminal exit path of loop diuretics. American Society of Nephrology Renal Week 2009, San Diego, 平成 21 年 10 月 29 日
9. 安西尚彦, Promsuk Jutabha, 櫻井裕之: ループ利尿薬の経上皮細胞性分泌の分子機序: 新規ヒト電位依存性有機酸トランスポーター分子 hOATv1 の同定, 生理学研究所

研究会「上皮組織における細胞外環境感受機構」, 岡崎, 平成 21 年 11 月 10 日

10. Promsuk Jutabha, 安西尚彦, 金子周司¹, 櫻井裕之^(¹京大院・薬)(ポスター): 新規ヒト電位依存性有機酸トランスポーター hOATv1 の分子同定: ループ利尿薬排出経路の解明, トランスポーター研究会第 3 回九州部会, 鹿児島, 平成 21 年 11 月 21 日
11. 安西尚彦, Promsuk Jutabha, 金子周司¹, 遠藤 仁, 櫻井裕之^(¹京大院・薬)(ポスター): 新規ヒト電位感受性有機酸トランスポーター hOATv1 の分子同定, 第 24 回日本薬物動態学会年会, 京都, 平成 21 年 11 月 27 日
12. 安西尚彦, Promsuk Jutabha, 金子周司¹, 遠藤 仁, 櫻井裕之^(¹京大院・薬)(ポスター): 新規ヒト電位依存性有機酸トランスポーター hOATv1 の分子同定: ループ利尿薬排出経路の解明, 第 30 回日本臨床薬理学会年会, 横浜, 平成 21 年 12 月 4 日
13. 安西尚彦, Promsuk Jutabha, 金子周司¹, 櫻井裕之^(¹京大院・薬): 新規ヒト尿酸排出トランスポーター URATv1 による尿酸輸送の電気生理学的解析, 第 43 回日本痛風核酸代謝学会総会, 大阪, 平成 22 年 2 月 26 日
14. 安西尚彦, Promsuk Jutabha, 北村健一郎¹, 谷口敦夫², 金子周司³, 山田秀臣⁴, 嶋田英敬⁵, 富田公夫¹, 浦野和子², 山中 寿², 関 常司⁴, 藤田敏郎⁴, 楊 國昌⁶, 山田 明⁷, 内田俊也⁸, 遠藤 仁, 櫻井裕之^(¹熊本大院・医, ²東京女子医大大・リウマチ痛風膠原病センター, ³京大院・薬, ⁴東京大学・腎内分泌内科, ⁵嶋田病院, ⁶杏林大・医・小児科, ⁷杏林大・医・内科, ⁸帝京大・医): 新規ヒト有機酸排出トランスポーター hOATv1 の分子同定, 第 43 回日本痛風核酸代謝学会総会, 大阪, 平成 22 年 2 月 26 日
15. 安西尚彦, Promsuk Jutabha, 櫻井裕之: 腎臓尿酸輸送の分子機序, 第 83 回日本薬理学会年会 シンポジウム S1H-9 高尿酸血症・痛風治療のブレイクスルー, 大阪, 平成 22 年 3 月 16 日
16. Promsuk Jutabha, Naohiko Anzai, Kenichiro Kitamura¹, Atsuo Taniguchi², Shuji Kaneko³, Hideomi Yamada⁴, Hidetaka Shimada⁵, Kohei Uchimura¹, Manabu Hayata¹, Jun Morinaga¹, Wako Urano², George Seki⁴, Shunya Uchida⁶, Hitoshi Endou⁷, Hiroyuki Sakurai^(¹熊本大院・医, ²東京女子医大大・リウマチ痛風膠原病センター, ³京大院・薬, ⁴東京大学・腎内分泌内科, ⁵嶋田病院, ⁶帝京大・医, ⁷ジェイファーマ株式会社): Mutations in renal drug efflux transporter hOATv1 cause hyperuricemia, 14th International Congress of Endocrinology, 京都, 平成 22 年 3 月 28 日

小胞体ストレスにおける SNARE 蛋白質の役割

須 賀 圭

杏林大学医学部細胞生理学

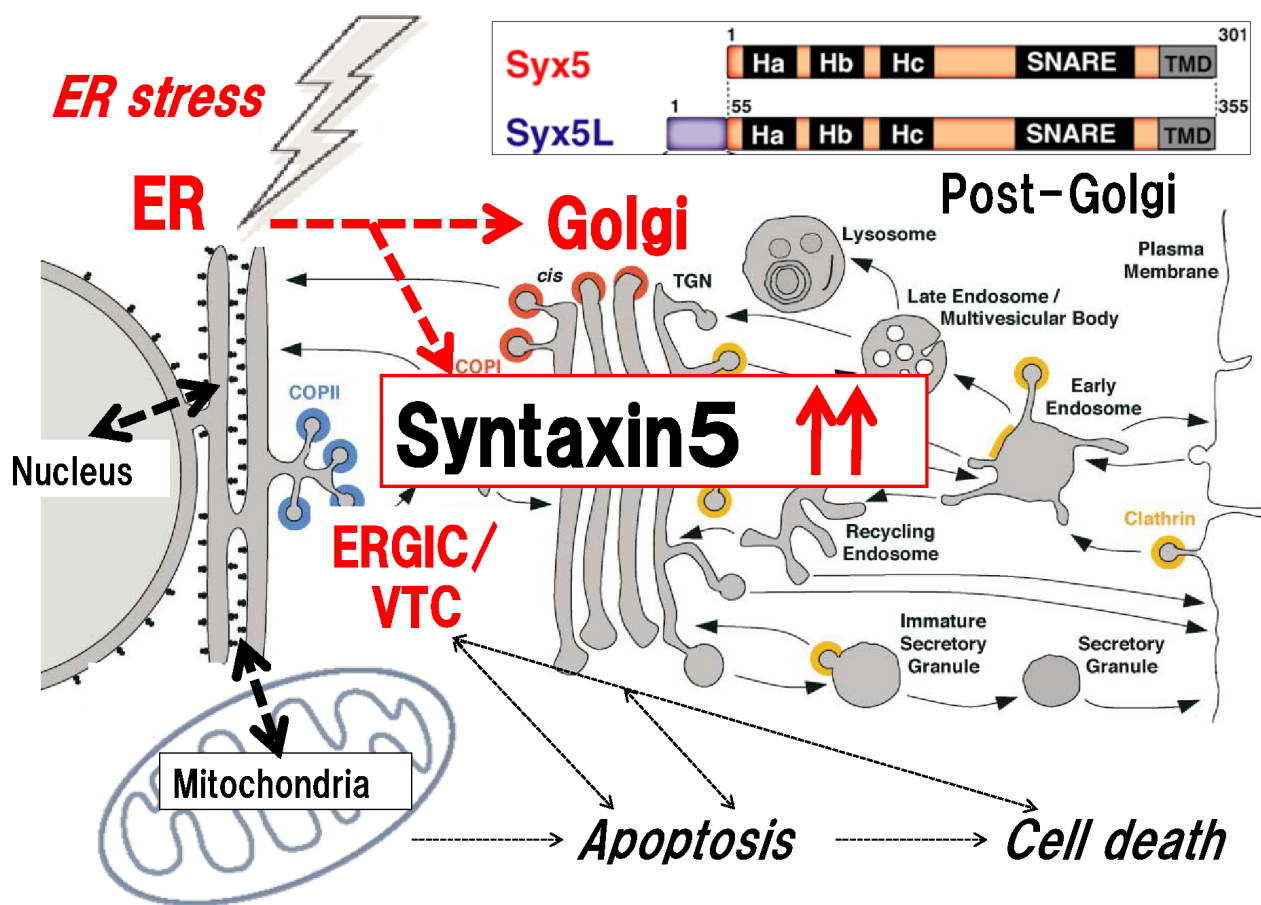
小胞体 (ER) ストレスが ER を起源として細胞全体にどのように波及し、細胞の運命や寿命をどのように決定付けているのかという基礎的なメカニズム、さらには ER ストレスに伴う細胞内蛋白質輸送機構の乱れや破綻の機構を理解することは、細胞の生存のみならず神経変性疾患発症機構の解明に向けて重要な目標の 1 つである。核と ER 間のストレスシグナル伝達に関する研究は活発であるが ER ストレスが Golgi 体を介して細胞全体にどのように波及していくのかは全く明らかではない。

申請者は一貫していわゆる targetSNARE (t-SNARE) として細胞内小胞輸送に関与する Syntaxin (Syx) ファミリーの構造機能活性相関ならびにその生理機能について研究して来た (Suga K. *et al.*, *J. Biochem.*, 2003)。その中において、細胞内の内膜系に局在する Syx5 がアルツハイマー病 (AD) 関連蛋白質の細胞内輸送やプロセッシングの過程に関与すること (Suga K. *et al.*, *Biochem. J.* 2004, Suga K. *et al.*, *J. Neurochem.*, 2005) や、過剰発現と RNA 干渉 (RNAi) の手法を用いた Knock-down により Syx5 の発現量を変化させると Golgi 装置の形態変化並びに膜蛋白質輸送の障害が引き起こされることも示してきた (Suga K. *et al.*, *FEBS lett.*, 2005)。それらの結果は、ER から Golgi にかけて存在する Syx5 を中心とした SNARE 蛋白質が、細胞内小胞輸送を制御するのみならず、細胞の広範な生理機能の制御を担っている可能性を示唆する。その更なる展開として、ER ストレス誘発時における Syx5 を中心とした SNARE 蛋白質の役割を検証した。

本研究では、細胞内小胞輸送や形質膜輸送を制御する Syx ファミリーの中において、特異な機能を有することを示した Syx5 アイソフォームに焦点を絞り、株化培養細胞ならびに初代培養海馬神経細胞に ER ストレ

ス負荷を与えた系において、それらの発現量および細胞内動態の変化を当てて解析した。免疫化学的手法により Syx5 アイソフォームの細胞内局在を検討したところ、ER ストレス負荷を与えた細胞において Syx5 アイソフォームは斑点状に局在し、Syx5 アイソフォームの発現を knock-down した時にも同様に見られるいわゆる Golgi fragmentation が観察された。Syx5 アイソフォームの役割の差異も考慮しながら、ER ストレス誘発剤である Brefeldin A (ER-Golgi 間の小胞輸送を阻害する毒素; BFA) の効果を詳細に検討したところ、同誘発剤は AD 関連蛋白質の 1 つである β APP の ER-Golgi 間の細胞内輸送を阻害することにより、そのプロセッシングを抑制することを見出した。さらに、同様の阻害効果は Syx5 の過剰発現によっては見られたものの、もう一つのアイソフォームである Syx5L では起こらないことが分かり、 β APP のプロセッシングと細胞内輸送に対して Syx5 アイソフォームの効果が異なることを見出し報告した (Suga K., *et al.*, *J. Biochemistry* 2009)。また様々な培養細胞ならびに初代培養海馬神経細胞において Thapsigargin (ER 内 Ca^{2+} ホメオスタシスの攪乱; Tg) で処理することにより ER ストレス負荷を行うと、Syx5 アイソフォームの蛋白質レベルならびに mRNA レベルにおける発現量が増加することを見出した。この発現量の増大は調べた他の Syx では見られない特有なものであることが分かった (Suga K., *et al.*, *in preparation*)。

今後、その効果を膜蛋白質の輸送・糖鎖修飾・Golgi 体構造のダイナミクスと共に解析する予定である。生化学的解析と生細胞におけるダイナミクスを統合して解析することにより、ER ストレス時に Syx5 を中心とした SNARE 蛋白質群がどのような機序で膜蛋白質の糖鎖修飾を含めた正常な生合成や細胞内輸送の過程に関与する



のかを時空間的に明らかにできればと考えている。それにより、ER ストレスが ER を起源として細胞全体にどのように波及して、アポトーシスなどのような細胞の運命決定がなされるかの解明に向けた 1 つの手がかりになると考えている。また ER ストレスに伴う細胞内蛋白質輸送機構の乱れや破綻の基礎的なメカニズムを理解することは、AD を始めとする神経変性疾患発症機構の解明する上でも意義があると考えている。

List of publication

1. Kei Suga, Ayako Saito, Takami Tomiyama, Hiroshi Mori and Kimio Akagawa The Syntaxin5 isoforms Syx5 and Syx5L have distinct effects on the processing of β APP *J. Biochem.* Vol. 146, No. 6, 905 - 915 (2009)

講演記録

1. Suga K, Saito A, Tomiyama T, Mori H, and Akagawa K: Role of Syntaxin5 isoforms on the processing and trafficking of β APP in the ER through the Golgi compartments. 第 52 回日本神経化学学会大会, 伊香保, 2009 年 6 月 22 日
2. 須賀 圭, 齋藤 綾子, 三嶋 竜弥, 赤川 公朗: 小胞体ストレスにおける SNARE 蛋白質の役割 第 38 回杏林医学会, 東京, 2009 年 11 月 21 日

赤内型マラリアワクチン候補抗原 MSP1 に対する宿主免疫応答機構の解明

小 林 富 美 恵

医学部・感染症学講座（寄生虫学部門）

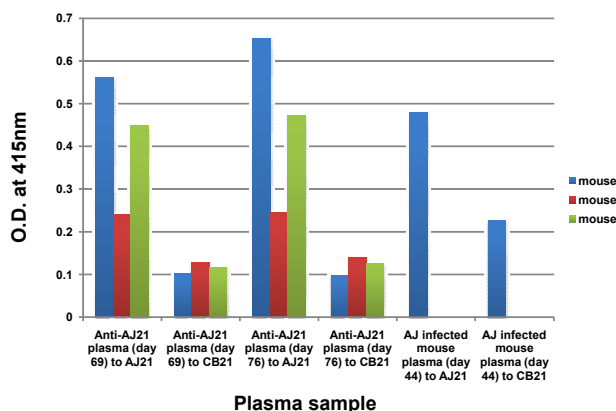
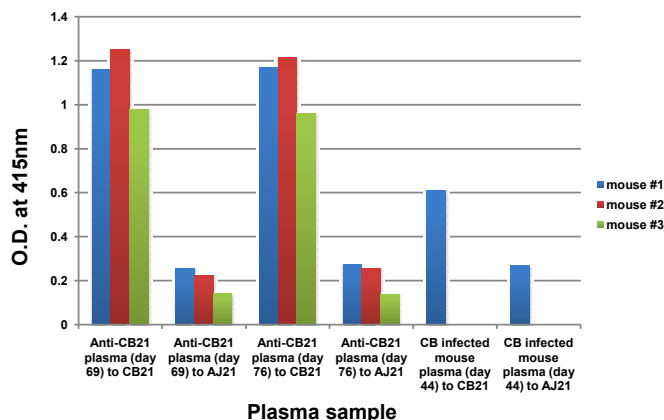
マラリアの流行地には、種は同一であっても様々な遺伝的多型性を示すマラリア原虫株が存在する。熱帯熱マラリア原虫感染では、ある原虫株に対して確立した免疫がその後の homologous な株の再感染は阻止するが、heterologous な株の再感染を阻止出来ないことがあり、この疾患に対する効果的なワクチンの開発を阻む一因となっている。この原虫株特異的防御免疫が如何にして確立するのかを理解するためには、それに関わる原虫抗原を同定し詳細な機序を明らかにしていくことが重要であるが、ヒトマラリアではアプローチが困難でこれまで詳細な研究がなされていなかった。熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* の主要メロゾイト表面タンパク (Pf-MSP1) は、赤血球への侵入ステージであるメロゾイトの表面にあるタンパクで、現在、最も期待されるマラリアワクチン候補抗原の 1 つである。Pf-MSP1 は宿主に防御免疫応答を誘発しそれに対する抗体はメロゾイトの侵入を防ぐが、多型性の極めて強い部位を数多く有している。最近、マウスマラリア原虫 *Plasmodium chabaudi* の遺伝的に異なる複数の株を用いて株特異的免疫に関与する MSP1 の部位が詳細に調べられ、MSP1 の C 末端から 19kDa に相当する部位である "Pf-MSP1₁₉" に相同の "Pc-MSP1₂₁" が株特異的免疫を制御する主要な候補分子であると考えられるようになってきた。そこで本研究では、マラリア原虫 MSP1 に対する免疫応答・制御機構の分子論的理解を最終目的とし、マウスマラリアモデル *P. chabaudi* の AJ 株と CB 株感染系を用いて解析を行うこととした。

(1) *P. chabaudi* 感染における株特異的免疫：まず、*P. chabaudi* の AJ 株と CB 株の複合感染において、株特異

的免疫が起こるかどうかを調べた。AJ 株と CB 株の赤内型原虫は形態的には区別がつかないので、新たに開発された proportional sequencing 法によって 2 株を識別した。その結果、AJ 株を 2 回感染させ、感染耐過後に AJ 株と CB 株を同時感染させたマウスでは、感染経過に伴って AJ 株が排除された。同様に、CB 株を 2 回感染させ、感染耐過後に AJ 株と CB 株を同時感染させたマウスでは、感染経過に伴って CB 株が排除された。これらの結果から、*P. chabaudi* 感染はマラリアおける株特異的免疫の有用なモデルとなり得ることが明らかとなった。

(2) *P. chabaudi* 原虫のリコンビナント MSP1₂₁ 抗原に対する抗体応答：MSP1 に対する抗体応答は、マウスやアジュバントの種類、抗原の投与経路によって異なることが知られている。そこで *P. chabaudi* の AJ 株と CB 株のリコンビナント MSP1₂₁(AJ-MSP1₂₁, CB-MSP1₂₁) に対する応答に最適な条件について検討した。その結果、C57BL/6 および BALB/c に対しては、抗原を皮下接種し投与回数が 3 回 (2 ~ 3 週間隔) で力価が急上昇すること、アジュバントなど免疫賦活剤としては Montanide 51, MPL-TDM, CpG が有効であることを明らかにした。これらの条件を用いて、AJ-MSP1₂₁ と CB-MSP1₂₁ に対する特異抗体応答を調べた結果、AJ-MSP1₂₁ と CB-MSP1₂₁ に対する抗体は、それぞれ、*P. chabaudi* の AJ 株と CB 株に特異的に反応することが明らかとなった (Figure1, Figure2)。

(3) リコンビナント AJ-MSP1₂₁、CB-MSP1₂₁ による感染防御効果：*P. chabaudi* AS 株の 21kDa 部位 (AS-MSP1₂₁)

Figure 1. AJ-MSP1₂₁に対する抗体はAJ株特異的であるFigure 2. CB-MSP1₂₁に対する抗体はCB株特異的である

と *P. yoelii* の 19kDa 部 位 (Py-MSP1₁₉; *P. chabaudi* の MSP1₂₁ と相同) は、いずれもそれらで免疫することによって感染防御効果を示すことが報告されている。しかし、これまでにリコンビナントタンパクについて報告があるのは *P. chabaudi* では AS 株のみで、AJ 株と CB 株の MSP1₂₁ については報告が全くない。そこで、(2) で得られた最適実験条件を用いて、これらのリコンビナントタンパクによって惹起された抗体がマウスに防御免疫を賦与するかどうかを調べた。その結果、抗 AJ-MSP1₂₁ 抗体、抗 CB-MSP1₂₁ 抗体のいずれも原虫の赤血球への侵入を阻止しなかった。しかし、極めて興味深いことに、これらのリコンビナントタンパクに対する抗体を持ったマウスでは、有意な延命効果が認められ病態の悪化が抑制されることが明らかとなった。今後、*P. chabaudi* の AJ-MSP1₂₁ と CB-MSP1₂₁ 部位による原虫株特異的病態抑制機序を明らかにすることにより、MSP1 based のワクチン開発にとって有用な情報が得られるばかりでなく、この主要な赤内型抗原に対する宿主免疫応答が、流行地における異なるジェノタイプのマラリア原虫の存在・分布にどのような影響を与えていくのかを理解するための基礎的情報が得られると期待される。

[研究業績]

1) 論文

1. Niikura M, Kamiya S, Nakane A, Kita K, Kobayashi E: IL-10 plays a crucial role for the protection of experimental cerebral malaria by co-infection with nonlethal malaria parasites. *International Journal for Parasitology* 40: 101-108, 2009.

2) 講演

1. Ishih A, Kobayashi F: Outcome of chloroquine treatment on *Plasmodium yoelii* 17XL infection in mice. 第 69 回日本寄生虫学会東日本大会, 東京, 平成 21 年 10 月 3 日.
2. 小林富美恵: 赤内型マラリアワクチン候補抗原 MSP1 に対する宿主免疫応答機構の解明. 第 38 回杏林医学会総会, 東京, 平成 21 年 11 月 21 日.
3. 小林富美恵: マラリア免疫の妙 ～如何に宿主はマラリア原虫を攻め, 如何に原虫はそれを回避するのか～. 第 4 回麻布大学生物科学総合研究所セミナー. 東京, 平成 21 年 12 月 10 日.
4. 小林富美恵: 感染症、寄生虫疾患の最近の話題 ～現状、対策、予防について～. 「第 1 回: 身近に迫る寄生虫」. 三鷹ネットワーク大学, 三鷹, 平成 22 年 3 月 2 日.
5. 新倉 保, 小林富美恵: マウスマラリア原虫複合感染における脾臓の役割. 第 3 回原虫感染免疫研究会, 長崎, 平成 22 年 3 月 26 日 - 27 日

運動をプローブとしたアルツハイマー型認知症予防に対する 新規ターゲット分子の検索

櫻井 拓也 小笠原 準悦 木崎 節子
大野 秀樹

杏林大学医学部衛生学公衆衛生学教室

【目的】

高齢化に伴う認知症患者の増加が大きな社会問題となっている。近年、運動はアルツハイマー病を含む認知症の予防に有効であることがわかってきた。運動によるアルツハイマー病発症の予防分子の1つとして、脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor : BDNF) が注目されている。BDNF は中枢および末梢神経の発生、成熟、生存などに重要な役割を果たしており、運動によってこの BDNF の発現増加が観察されている。運動による BDNF の増加はアルツハイマー病でみられる神経細胞死を抑制するのではないかと推測されているが、アルツハイマー病予防に対する運動効果のメカニズムについてはまだ十分な検討が行われていないのが現状である。本研究は、アルツハイマー病予防のツールとしての運動に注目し、脳における新たな運動特異的な分子を DNA アレイ法を用いて網羅的に検討し、アルツハイマー型認知症予防のための新たな標的分子を発見することを目的とした。

【方法】

老化促進モデルで学習・記憶障害を示す senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) マウス (アルツハイマー型認知症モデルマウス, 2 カ月齢) を運動トレーニング (TR) 群 (TR-SAMP8 マウス) とコントロール群 (SAMP8 コントロールマウス) に分けた。TR-SAMP8 マウスは回転かごの付いたケージで飼育し、4 カ月間の自発運動走による TR を行わせた。両群及び老化促進、学習・記憶障害を示さない senescence-accelerated mouse

resistant 1 (SAMR1) マウスに対して恐怖条件付けテストによる記憶テストを行った。具体的には、各マウスを電線が敷いてある箱に入れ、音と光刺激を組み合わせた電気ショックを 10 回与え、24 時間後に再び同じ箱に入れて 3 分間すくみ反応 (freezing) を観察した (文脈恐怖記憶)。また、電気ショックを与えた箱とは別の箱に入れ、57 秒間音と光刺激を与えたときのすくみ反応を観察した (キュード恐怖記憶)。テスト終了後、3 群の海馬サンプルから total RNA を抽出し、各マウス間の遺伝子発現の差異を DNA アレイ法を用いて網羅的に検索した。得られた DNA アレイの結果をもとに、発現変化が顕著な遺伝子、コードしているタンパク質の機能がアルツハイマー病予防に影響を及ぼすと予想される遺伝子を抽出した。

【結果・考察】

TR-SAMP8 マウスでは 1 日あたり約 5 km の走行が認められ、同マウスのヒラメ筋のクエン酸合成酵素の活性は SAMP8 コントロールマウスよりも有意に高かったことから十分な運動効果が確認された。恐怖条件付けテストでは、SAMP8 コントロールマウスの文脈恐怖記憶が SAMR1 マウスに比べて障害されていたが、TR-SAMP8 マウスでは障害がみられなかった (図 1a)。しかし、キュード恐怖記憶に関しては SAMP8 コントロールマウスで障害されておらず、TR の影響もみられなかった (図 1b)。文脈恐怖記憶は海馬依存的な記憶であり、キュード恐怖記憶は扁桃体依存的な記憶であると考えられていることから、TR はアルツハイマー病の発症

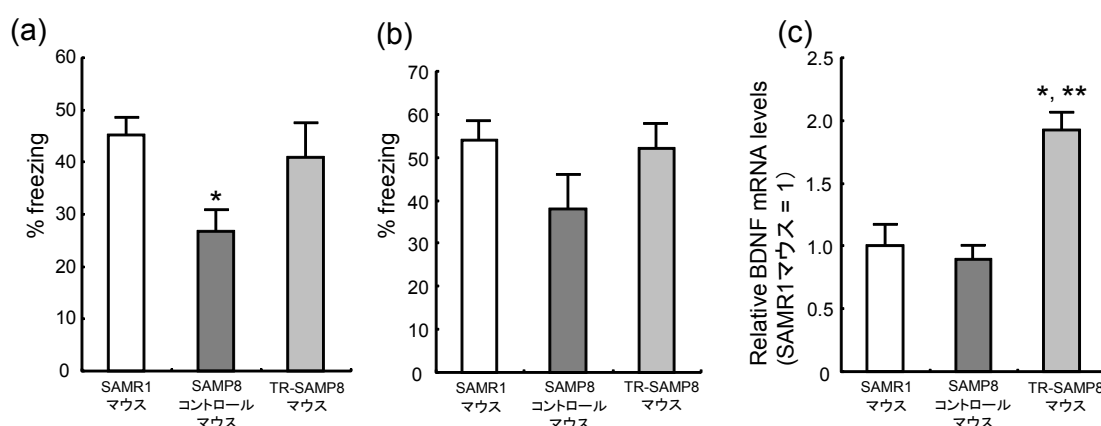


図 1. 恐怖条件付けテストと海馬における BDNF の遺伝子発現

文脈恐怖記憶 (a) とキュード恐怖記憶 (b) に対する運動効果. SAMR1 マウス (n=8); SAMP8 コントロールマウス (n=8); TR-SAMP8 マウス (n=7). Mean $\pm$ SE. *P < 0.05 vs. SAMR1 マウス. (c) 海馬における BDNF 遺伝子発現に対する運動効果. Real time PCR 法で海馬の BDNF の遺伝子発現を検討した. SAMP8 コントロール及び TR-SAMP8 マウスの値は, SAMR1 マウスの値を 1 としたときの相対値として表した. SAMR1 マウス (n=4); SAMP8 コントロールマウス (n=4); TR-SAMP8 マウス (n=3). Mean $\pm$ SE. *P < 0.05 vs. SAMR1 マウス, **P < 0.05 vs. SAMP8 コントロールマウス.

表 1 DNA アレイで発現変化がみられた代表的な遺伝子

	SAMR1	SAMP8 コントロール	TR-SAMP8
Prolactin receptor	1	0.58	1.34
Transthyretin	1	0.40	1.08
Klotho	1	0.57	1.32
Leucine zipper transcription factor-like 1	1	0.42	0.89
Short-coiled coil protein	1	0.49	0.99
Calmodulin binding transcription activator	1	0.45	0.86
Calcium binding protein 39-like	1	0.62	1.11
Rho GTPase activating protein 5	1	0.57	0.98
Syntaxin binding protein 4	1	0.61	1.07

SAMP8 コントロール及び TR-SAMP8 マウスの値は, SAMR1 マウスの値を 1 としたときの相対値として表した.

に密接に関連する海馬の障害を改善することが示唆された。一方, TR-SAMP8 マウスの海馬では既報の通り BDNF の遺伝子発現の増加が観察された (図 1c)。さらに, DNA アレイの結果から SAMP8 コントロールマウスの海馬において多くの遺伝子発現が SAMR1 マウスに比べて減少していることがわかった。SAMP8 コントロールマウスの海馬で発現の減少が観察された代表的な遺伝子には, ストレスによる海馬でのニューロン新生の低下を抑えると報告されているプロラクチンの受容体, 老

化遺伝子である klotho, 不溶性フィブリンを形成することによってアミロイド病を引き起こすことが知られている transthyretin, 海馬シナプスの長期増強に非常に重要なカルシウムに結合すると推察される calcium binding protein 39-like や転写因子としての機能が予想されている leucine zipper transcription factor-like 1 (Lztf1) などがあった (表 1)。さらに, 興味深いことに, TR-SAMP8 マウスではこれらの遺伝子の発現低下が観察されなかった (表 1)。

以上のことから、TR は SAMP8 マウスの海馬依存的な記憶障害を予防することが示された。本研究においても TR によって海馬の BDNF 遺伝子の顕著な増加が認められたことから、記憶障害の予防における BDNF の重要性が推察された。さらに、DNA アレイの結果から、新規アルツハイマー型認知症予防関連分子としていくつかの候補遺伝子が得られた。これらの遺伝子の中には Lztfl1 などの脳での役割について未知な遺伝子が含まれており非常に興味深い。今後、これらの分子と記憶障害との関連について検討を行い、アルツハイマー型認知症予防のための新たな標的分子の同定を目指したい。

【謝辞】

本研究に御協力いただきました杏林大学医学部細胞生理学教室、藤原智徳先生、赤川公朗先生に深く感謝いたします。

List of publications

1. 櫻井拓也, 小笠原準悦, 木崎節子, 石橋義永, 白土健, 井澤鉄也, 今泉和彦, 鈴木健二, 野口いづみ, 芳賀脩光, 大野秀樹: 運動トレーニングによる肥満・生活習慣病および認知症予防効果とそのメカニズム. 人間科学研究 23 Supplement: 131, 2010.

学会発表

1. 櫻井拓也, 小笠原準悦, 木崎節子, 大野秀樹: (平成 21 年度杏林大学医学部研究奨励賞中間報告) 運動をプロンプとしたアルツハイマー型認知症予防に対する新規ターゲット分子の検索. 第 38 回杏林医学会総会, 三鷹, 平成 21 年 11 月 21 日.
2. 櫻井拓也, 小笠原準悦, 木崎節子, 石橋義永, 白土健, 井澤鉄也, 今泉和彦, 鈴木健二, 野口いづみ, 芳賀脩光, 大野秀樹: 運動トレーニングによる肥満・生活習慣病および認知症予防効果とそのメカニズム. 文部科学省学術フロンティア研究プロジェクト「ライフステージに応じた健康増進と多様性保持」第 4 回研究会, 所沢, 平成 22 年 1 月 6 ~ 7 日.

生体顕微鏡計測による陰圧環境下での創傷治癒機序の解明と 陰圧閉鎖治療システムの開発

大 浦 紀 彦

杏林大学医学部形成外科学

褥瘡，糖尿病性壊疽，重症虚血肢などの慢性創傷治療において，閉鎖湿潤環境を維持したまま創部に陰圧を負荷し滲出液の除去と感染管理をおこなう陰圧閉鎖療法（negative pressure wound therapy：以下 NPWT）が注目されている。

これはポリウレタンフィルムの下にチューブを挿入し，陰圧を創部に持続的または間歇的に負荷し，膿や滲出液を排出するものである。この治療方法は，1990年代に開発が進み，欧米ではもう既に臨床応用されている。本邦でも，ようやく V.A.C.®(KCI 社，米国) の医療機器として薬事承認され，2010 年 4 月より保険診療の枠組みの中での臨床使用が始まった。

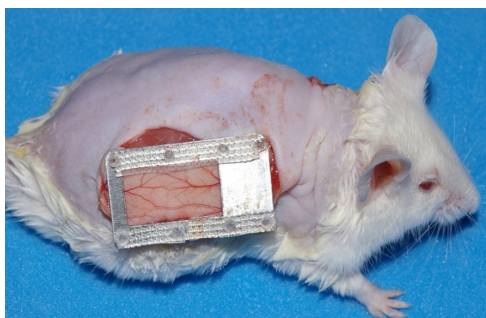
NPWT には，創傷治癒を阻害する滲出液およびバクテリアの除去の他に，肉芽形成・組織血流増加，組織間液の除去による浮腫の軽減といった臨床における創傷治癒促進効果がある。

そこで本研究では，陰圧環境が生体の創傷治癒を促進する機序を血行力学および物質交換の面からの解明を目的とし，陰圧環境下で微小循環動態を生体顕微鏡下に直接可視化できるモデルの開発を行った。

微小循環を下肢可視化するモデルは，いくつかあるが，代表的なモデルにおいて陰圧を負荷した。

1. マウス total skin chamber

マウスの皮下血管網を含めた total skin chamber を使用



し，ガラス板とフィルムの間に 24G のサーフロー針を挿入し 100mmHg の陰圧を負荷した。当初陰圧が負荷に難渋したが，パテやフィルムの工夫によって陰圧負荷は可能となった。しかし陰圧を負荷によって血流が途絶し，皮弁が壊死となり微小循環の観察には至らなかった。

2. ラット睾丸挙筋を使った微小循環可視化モデル

ラットの睾丸挙筋を使用した微小循環可視化システムに，フィルムを静置し挙筋との間に 24G のサーフロー針を挿入し陰圧を負荷した。リークが多く，血流は維持できるもの，陰圧負荷が不安定で，モデル開発まで至らなかった。

3. マウス背部の筋膜を使った微小循環可視化モデル

マウス背部の筋膜上の微小循環（右図）を透過光ではなく，落射光にて観察する手法を用いた。血液の流れを，FITC デキストランを用い高感度 CCD と GFP フィルタを使用した結果，可視化することが可能となった。

フィルムに陰圧を負荷することによって，血管が約 10% 拡張することが示された。

現在，①細動脈と細静脈のどちらが拡張するのか，②血管が外力によって閉塞しない圧はどのくらいなのか，③透過光での観察モデルの開発を行っているところである。



顔面神経麻痺治療を目的とした 埋め込み型随意筋電誘発機能的筋刺激装置の開発

栗 田 昌 和

杏林大学医学部形成外科学

本研究では健側の顔面表情筋運動によって麻痺側の表情筋運動を制御することのできる埋め込み型の装置を開発し、従来法ではなしえない自然な表情筋運動を達成することを目的とした。

1) シミュレーションスタディーによる筋電制御型電気刺激装置の治療手段としての有効性の検証

実験プロトコルについて、倫理委員会の審議、承認の後、健常被検者において局所麻酔を用いて作成した一時的顔面神経麻痺をモデルとして、共同研究者の村岡の開発した筋電制御型機能的筋刺激装置の治療有用性を検討した。筋電から電気刺激への変換アルゴリズム（具体的には装置内のプログラム）の最適化を行い、最終的に最適化された動作についてオプティカルフローを用いた顔面表情運動解析システム FEMAS-1 を用いて解析を行った。

臨床上十分に有用と考えられるような顔面表情運動を再現することが可能であったため、本システムの顔面神経麻痺への治療応用の実現可能性について、論文報告した。

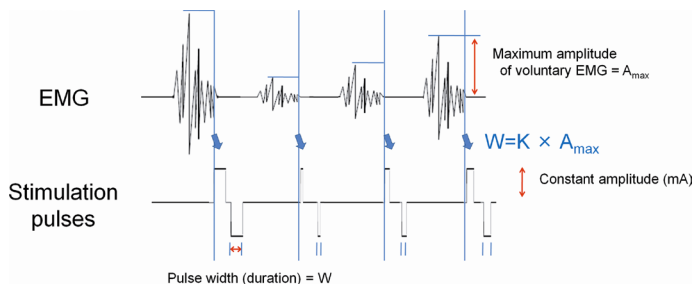
(Kurita et al. Feasibility of bionic reanimation of a paralyzed face: A preliminary study of functional electrical stimulation of a paralyzed facial muscle controlled with the electromyography of the contralateral healthy hemiface Plast Reconstr Surg. 2010 ; 126(2) : 81e-3e.)

2) 麻痺患者における電気刺激実験による適応範囲の検討

実験プロトコルについて、倫理委員会の審議、承認の上、顔面神経麻痺患者において麻痺側筋体の電気刺激を行い、筋体収縮に必要な電気刺激強度を計測した。麻痺の発症から比較的期間の短い顔面神経麻痺の4症例において検討を行った。発症1年経過した1症例において、筋体収縮が認められたが、そのほか2症例（いずれも麻痺発症後1年程度経過）では有効な筋体の収縮を認められなかった。腫瘍性病変切除のために神経の切離を行った1症例では、直後には健側と同様の刺激強度で、筋体の最大収縮を認めたが、麻痺発症10日目の時点ですでに疼痛閾値内の電気刺激では有効な筋体収縮を認めなかった。本システムの有効な作動を実証するためには、継続的な埋込み刺激が必要であると判断された。

3) 継続的な埋込み実験を目的とした動物モデルの開発

顔面神経支配で、継続的に筋体収縮の定量的評価が可能な筋体であることから家兎の外耳介筋をモデルとして使用した。（外耳介筋の収縮は耳介のしょう立角度によって定量的に評価が可能である）10羽のNewzealand White Rabbitを用いて外耳介筋の解剖を行い耳介基部と

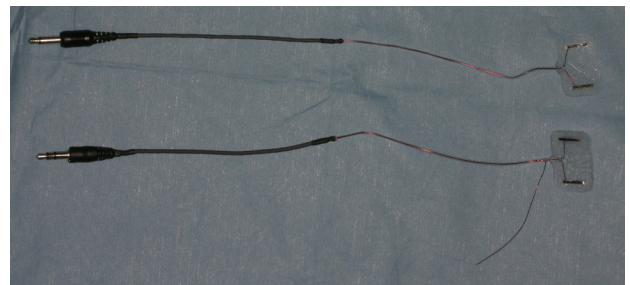
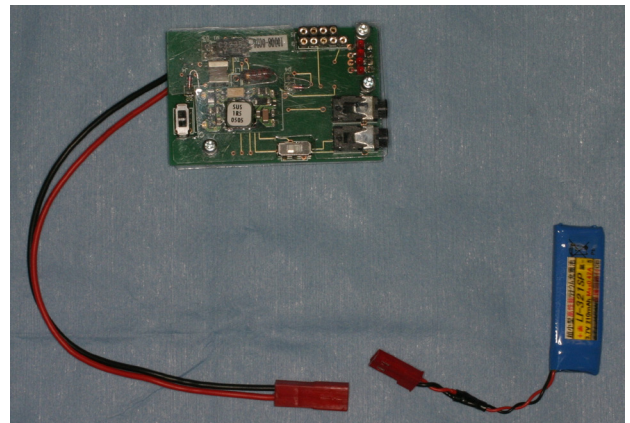


頭蓋骨の間に存在する scutulo-auricularis muscle が継続的な刺激装置埋め込みに適していると判断した。

4) 埋込みを目的とした小型筋電制御型電気刺激装置の開発

1 項で、使用した筋電制御型電気刺激装置同様の筋電感知・筋刺激を可能としながら動物皮下に埋入が可能なシステムの開発を行った。共同研究者の村岡の協力を経て、 $3.5 \times 5.0 \times 1.0$ cm の小型化された基盤（右上図）によって、十分な作動を得ることが可能となった。動物実験を目的として埋め込み機体を 10 機量産した。さらに十分な生体親和性を有し、2 項で開発した動物モデルに使用可能な仕様の感知・刺激用電極を作成した（右下図）。

申請書作成時現在、上記 4 項で作成した基盤、刺激電極に合わせて、長期間埋め込みに適したケース（チタン製）を開発、作成している。今後も、本研究機関で得られた知見をもとに本研究を推進していく。



講演記録

1. 顔面神経麻痺治療を目的とした埋め込み型随意筋電誘発機能的筋刺激装置の開発 栗田昌和, 多久嶋亮彦, 村岡慶裕, 白石知大, 木下幹雄, 尾崎峰, 波利井清紀 第 52 回日本形成外科学会総会・学術集会 2009 年 4 月 22-24 日 (22 日) パシフィコ横浜 神奈川
2. Development of implantable EMG-controlled functional electrical stimulation device for the paralyzed face. Masakazu Kurita, Akihiko Takushima, Yoshihiro Muraoka, Tomohiro Shiraishi, Mikio Kinoshita, Mine Ozaki, Kiyonori Harii. XI International Facial Nerve Symposium. 25-28, April, 2009, Spazio Etoile, Rome, Italy
3. 顔面神経麻痺治療のための新デバイス開発 第 2 報 栗田昌和, 多久嶋亮彦, 村岡慶裕, 白石知大, 尾崎 峰, 波利井清紀 第 32 回日本顔面神経研究会 2009 年 6 月 4-5

日 (5 日), 淡路夢舞台国際会議場 兵庫

4. Development of implantable EMG-controlled functional electrical stimulation device for the paralyzed face. Masakazu Kurita, Akihiko Takushima, Yoshihiro Muraoka, Tomohiro Shiraishi, Mikio Kinoshita, Mine Ozaki, Kiyonori Harii. Oct 8-10 10th Congress of IPRAS/APS, Shinjuku, Japan.

List of publications

1. Feasibility of bionic reanimation of a paralyzed face: A preliminary study of functional electrical stimulation of a paralyzed facial muscle controlled with the electromyography of the contralateral healthy hemiface Kurita M, Takushima A, Muraoka Y, Shiraishi T, Harii K. Plast Reconstr Surg. 2010 ; 126(2) : 81e-3e.